

**Vergleichende experimentelle Untersuchungen
über die Beziehungen zwischen Aktivität und Toxi-
zität von Nativheparinen und Heparinoiden**

Volodymyr Bunecky



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0116

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

VERGLEICHENDE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AKTIVITÄT UND TOXIZITÄT VON
NATIVHEPARINEN UND HEPARINOIDEN



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Volodymyr Bunecky
geb. Boryslaw/Ukraine
wohn. Syracuse/USA

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. med. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: **7. OKT. 1958**

Meiner lieben Frau gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Allgemeiner Teil und eigene Untersuchungsergebnisse	7
Diskussion	26
Experimenteller Teil	31
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	51

Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Aktivität und Toxizität von Nativheparinen und Heparinoiden.

Im letzten Jahrzehnt ist Heparin nicht nur zum wesentlichsten Causaltherapeutikum bei bedrohlichen thromboembolischen Zuständen geworden, sondern es zeigte sich, dass ihm darüber hinaus noch eine Reihe weiterer Wirkungen zukommt, welche diese körpereigene Substanz immer mehr in den Mittelpunkt nicht nur des wissenschaftlichen, sondern auch des klinischen Interesses rücken. Es liegt nicht im Rahmen dieser Ausführungen, näher hierauf einzugehen, es sei jedoch an die günstige Heparinwirkung bei Arteriosklerose, Hochdruck, Polyarthrit, Angina pectoris, Herzinfarkt etc. erinnert, Wirkungen, die sich zwar z. T. noch im Anfangsstadium der klinischen Prüfung befinden, die jedoch deutlich zeigen, dass dem Heparin im Organismus eine Fülle von Funktionen zu obliegen scheint, von denen wir heute vielleicht erst wenige aufzuzeigen im Stande sind. (1).

Mit wachsender klinischer Bedeutung und in Kenntnis der mannigfaltigen Nebenwirkungen des Heparins auf viele Stoffwechselvorgänge, ergibt sich die Forderung nach einer endgültigen Klärung der Frage der biologischen Wirksamkeit und der Toxizität. In gleicher Weise, ja in noch viel größerem Masse, muss die Lösung dieser Frage für die Heparinoide, die synthetischen Handelspräparate mit heparinähnlicher Wirkung von Bedeutung sein. Gerade für synthetische Erzeugnisse, die körpereigene, biologisch wirkende Substanzen ersetzen sollen, muss die genaue Kenntnis der Beziehung zwischen biologischer Wirksamkeit und Toxizität die *conditio sine qua non* für die klinische Anwendung sein. Es scheint jedoch, dass für die Heparinoide diese, an sich selbstverständliche, pharmakologische Voraussetzung nicht immer in erschöpfendem Masse geklärt war, bevor ihnen das klinische Agreement erteilt wurde. Allerdings muss hier einschränkend eingewendet werden, dass es sowohl für Heparin als auch für Heparinoide nicht ganz einfach ist, die Frage der biologischen Aktivität erschöpfend zu klären. Dies hängt mit der Viel-

seitigkeit ihrer Wirkungen zusammen. Da es sich zudem um keineswegs indifferente Substanzen handelt, welche in Überdosierung früher oder später im Organismus eine bedrohliche Situation schaffen können, ist die biologische Wirksamkeit mit der Toxizitätsfrage eng gekoppelt.

Die Aktivität des Heparins wird in "internationalen Antithrombin-Einheiten (IE)" bestimmt. Von einem guten Präparat werden 100 IE/mg Trockensubstanz gefordert. Es handelt sich bei dieser Heparineinheit nicht um einen biologischen Standart, wie z.B. bei den Hormonen, sondern um eine in vitro Standardisierung an tierischen Gerinnungssubstraten, welche von der Zusammensetzung des menschlichen Blutes z.T. erheblich abweichen. Neben seiner Antithrombinwirkung übt jedoch Heparin auch auf alle anderen Phasen der Gerinnung einen hemmenden Einfluss aus: es stabilisiert die Thrombozyten, wirkt als Antithrombokinase, Antiprothrombin, Antithrombin, verhindert die Retraktion des gebildeten Gerinnsels und fördert die Fibrinolyse, wenn auch dieser Wirkungsmechanismus noch nicht ganz geklärt ist. Heparin wirkt also auf das gesamte Gerinnungssystem. Es ist damit der einzig bekannte wirklich polyvalente Gerinnungsinhibitor.

Heparin ist keine einheitliche Substanz - seine Synthese gelang bisher nicht -, sondern ein Gemisch von Mucopolysaccharid-Mono-, Di- und Tri-Schwefelsäureestern, welche sich in ihrer gerinnungsphysiologischen Wirkung unterscheiden. Die verschiedenen Handelspräparate sind daher nicht identisch in Bezug auf Zusammensetzung, Konzentration und Wirkung, schon weil sie verschiedenen Ursprungs sind. Sie stammen meist aus Lunge und Lebern verschiedener Tiere. Daher müssen sie auch heute noch standardisiert werden. Und dies geschieht in internationalen Einheiten. Damit sind jedoch alle Heparinpräparate mit ihren mannigfaltigen Wirkungen auf eine Wirkung, nämlich die Antithrombinwirkung abgestimmt. Aus diesem Grunde kommt es auch bei manchen Patienten zu unterschiedlicher Verträglichkeit und Wirkung, wenn verschiedene Präparate benutzt werden, auch wenn sie sich in ihrer Einheitszahl gleich sind, weil eben diese Bestimmungsmethode nur eine Teilwirkung erfasst. Es hat daher nicht an skeptischen Hinweisen gefehlt die bisher gültige Standardisierung zu verlassen und statt dessen eine in vivo Methode in Form von Heparinwirkungskurven zu inaugurieren (JORGES 2). MARX (3) glaubt, dass bei Heparinen und Heparinoiden nur ungenügende

Schlüsse aus einem Einzelgerinnungstest auf ihre therapeutische Wirksamkeit gezogen werden können. Auch GASTPAR-BLASIUS-SEITZ (4) konnten in vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen Testen feststellen, dass sich die untersuchten Handelsheparine, trotz gleicher Anzahl an internationalen Einheiten, in ihrer Wirkung auf das Gerinnungssystem nicht identisch verhalten.

Trotz dieser Mängel, welche der Heparinstandardisierung also anhaften, kommt es mit den heutigen Handelspräparaten kaum zu Zwischenfällen, weil alle Markenpräparate einen sehr grossen Reinheitsgrad besitzen und aus tierischem Gewebe isoliert sind, ohne dass chemisch an ihrem Molekül etwas verändert wurde. Der Fraktionisierungsangang ist nicht sehr unterschiedlich, sie unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Stabilisatoren und Konservierungsmittel, was vor allem die unterschiedliche Farbe der Präparate bedingt. Deshalb besteht auch mit den heutigen Handelspräparaten kaum noch die Gefahr der Sensibilisierung, auch wenn die Präparate über mehrere Wochen hindurch in hoher Dosierung angewandt werden. An unserer Klinik wurden Patienten über 4 Wochen und länger ununterbrochen mit Heparin und Depotheparin behandelt, ohne dass es zu Unverträglichkeitserscheinungen oder sonstigen Zwischenfällen gekommen wäre (5).

Anders liegt der Fall hingegen bei den Heparinoiden. Diesen wird in der Literatur eine weitgehende Ähnlichkeit der Wirkung mit den Heparinen zugeschrieben. Auch sind sie mehr oder weniger polyvalente Gerinnungshemmer und sollen in die verschiedenen Gerinnungsphasen eingreifen. Sie werden in Milligramm dosiert. Ihre Dosierung wird mit der gerinnungshemmenden Wirkung der Reinheparine in Beziehung gebracht. Da sie alle bedeutend weniger wirksam sind als Heparin, muss je nachdem ein Mehrfaches des betreffenden Heparinoids gegeben werden, um eine gleich starke Gerinnungsverzögerung zu erzielen. Es ist jedoch keineswegs so, dass die Wirkungen der Heparinoide auf das Gesamtgerinnungssystem gleichsinnig mit denen des Heparins sind, auch wenn man die kleinere Wirkungsstärke der Heparinoide berücksichtigt. Es hat sich gezeigt, dass sich die Heparinoide in ihrer Wirkung auf die einzelnen Gerinnungsphasen zum Teil ganz anders verhalten als Nativheparin (SEITZ-GASTPAR-GOOSSENS 5, 29).

Der Haupteinwand gegen eine kritiklose Anwendung der Heparinoide liegt jedoch in ihrer mehr oder weniger hohen Toxizität begründet. Die meisten von ihnen waren so toxisch, dass sie für therapeutische Zwecke von vornherein überhaupt nicht in Frage kamen, bzw. dass sie nach kurzer Anwendung in der Klinik wegen schwerer Zwischenfälle wieder zurückgezogen werden mussten. Von den wenigen Präparaten, welche in den Handel kamen, hat sich bisher nur das Thrombozid⁺ gehalten. Es ist ein synthetischer Xylan-Polyschwefelsäureester. Jedoch auch mit diesem Präparat wurden von verschiedenen Autoren Zwischenfälle gesehen. Bedenklich musste es vor allem stimmen, als STUDER-ENGELBERG-RANDALL (6) über schwere toxische Schädigungen am Hund berichteten, welche mit Thrombozid schon nach wenigen Injektionen von 20mg/kg evident wurden. Diese Befunde konnten kürzlich von HARDEGG-HARTERT (7) in vollem Umfang bestätigt werden.

Über die gerinnungsphysiologische Aktivität und die Höhe der therapeutischen Dosierung mit Thrombozid gehen die Ansichten der Autoren weitgehend auseinander. Im Vergleich zu einer ausreichenden Heparintherapie geben die verschiedenen Untersucher für Thrombozid die zweieinhalb bis dreizehnfache Menge an. Diese Verhältniszahlen wurden auf Grund von verschiedenen in vitro und in vivo Untersuchungen am Menschen ermittelt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1:

Verhältniszahlen für die dem Nativheparin äquivalente Menge Thrombozid, gemessen mit verschiedenen in vitro und in vivo Gerinnungstesten am menschlichen Blut, bzw. Plasma.

	Verhältnis Heparin/Thrombozid
MARX (8)	1 : 2,5
MATIS (9)	1 : 3
FAVRE-GILLY (10)	1 : 3,5
RUNGE u. Ma. (11)	1 : 10
BELLER (12)	1 : 10
HARTERT (13)	1 : 13

⁺ Hersteller: W. Benend, K.G. München.

In einzelnen speziellen, *in vitro* Gerinnungstesten konnte HARTERT sogar noch einen stärkeren Wirkungsabfall von Thrombozid gegenüber Heparin feststellen. Ferner scheinen dem Präparat grössere Schwankungen hinsichtlich der Aktivität der einzelnen Handelschargen anzuhäufen. HARTERT (7) konnte feststellen, dass Thrombozid in kürzlich durchgeführten thrombelastographischen Untersuchungen gegenüber früheren Untersuchungen deutlich weniger gerinnungsaktiv war.

Im Tierversuch am Kaninchen konnte GOOSENS (14) bereits vor einigen Jahren bei der experimentellen Thromboembolie mittels des von ihm entwickelten MYOTOXIN-THROMBOKINASE-TESTES (MTT) feststellen, dass man von Thrombozid etwa die fünffache Menge gegenüber Heparin benötigt, um einen ausreichenden Thromboembolieschutz zu erzielen. Auch EYSCHOLDT (15) konnte bei Prüfung der thrombolytischen Wirkung von Heparin und Thrombozid am Kaninchen mit der experimentellen Alexanthrombose ein Wirkungsverhältnis von 1 : 5 ermitteln.

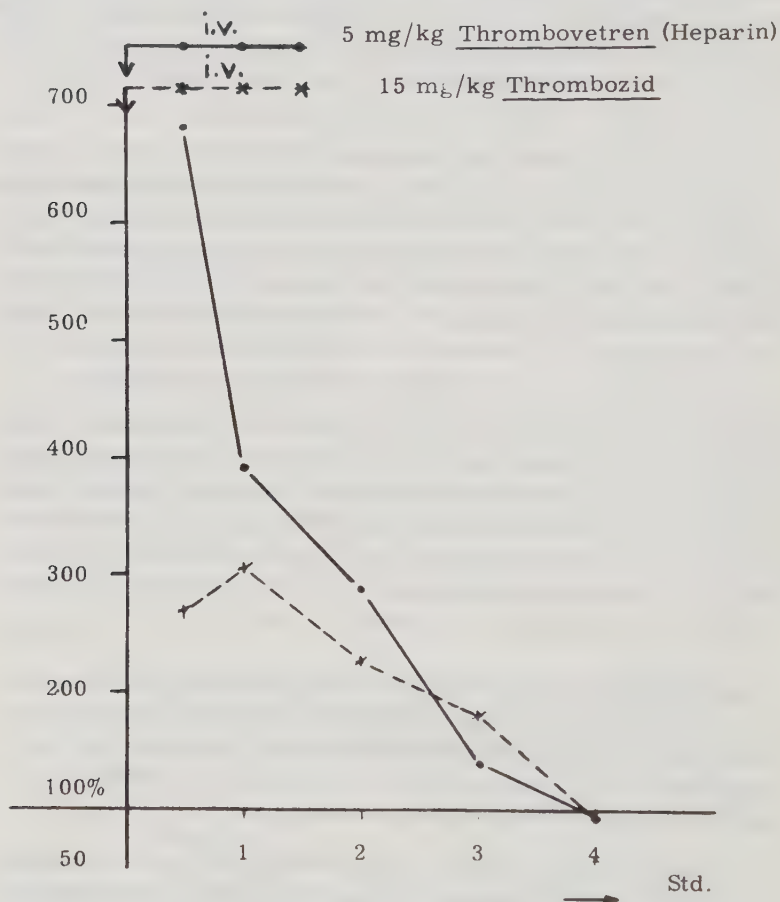
Da *in vitro* Einzelteste nicht immer ein genaues Bild über das Wirkungsverhältnis *in vivo* geben, wurden von MEYER (16) und HELLMANN (17) an unserer Klinik mit einem Nativheparin (Thrombovetren) und Thrombozid *in vivo* Wirkungskurven mit einer Globalbestimmungsmethode (Recalcifizierungszeit am Vollblut) am Kaninchen ermittelt. In analoger Weise wurden Wirkungskurven der Depotpräparate (Liquemin-Depot und Depot-Thrombozid) aufgestellt. (s. Abb. 1 und 2)

Es zeigte sich, dass trotz der gewählten dreifachen Menge von Thrombozid, bzw. Depot-Thrombozid die gerinnungsverzögernde Wirkung der Heparinpräparate nicht erreicht werden konnte. Nach diesen *in vivo* Versuchsreihen liegt die Aktivität des Thrombozids, zumindest am Kaninchen, zwischen $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{5}$ des Nativheparins.

Wenn wir für Heparin bei schweren Thrombosen eine tägliche Dosierung von ungefähr 50 000 IE zugrunde legen, was etwa 500 mg Trockensubstanz entspricht, so würde dies für Thrombozid, selbst wenn man für klinische Zwecke nur das Dreifache der Heparindosierung in Rechnung stellt, eine tägliche Menge von 1500 mg bedeuten. Bei einem Durchschnittsgewicht von 70 kg würde dies einer täglichen Dosis von etwa 20 mg/kg Körpergewicht entsprechen. Wenn man dabei die Befunde von

Abbildung 1:

Wirkungskurven für Heparin (Thrombovetren) und Heparinoid (Thrombozid) am Kaninchen mit der Recalzifizierungszeit.

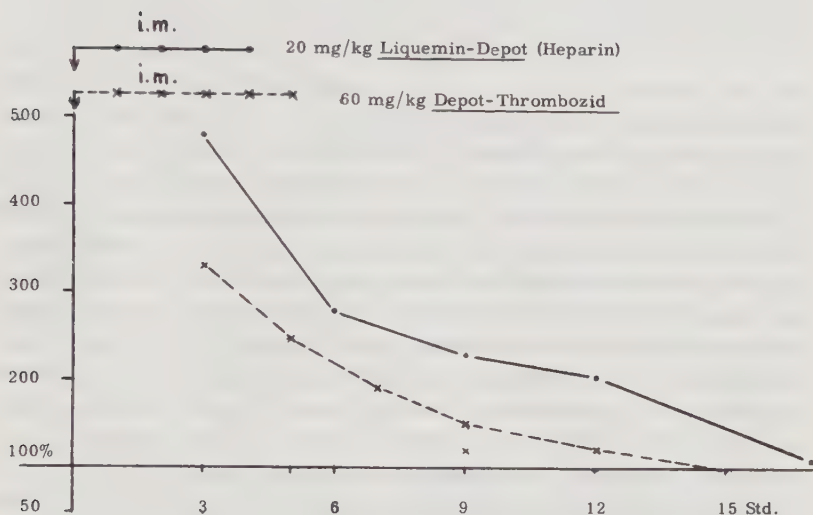


Wie aus Abb. 1 hervorgeht, hat am Kaninchen Thrombozid in dreifacher Dosierung gegenüber einem natürlichen Heparin bei der Recalzifizierungszeit eine deutlich schwächere Wirkung.

Die Kurven sind zitiert aus HELLMANN (17) und MEYER (16)

Abbildung 2:

Wirkungskurven für ein Depot-Heparin (Liquemin-Depot) und ein Depot-Heparinoid (Depot-Thrombozid), bestimmt mit der Recalcifizierungszeit am Kaninchen (Vollblut).



Wie aus Abb. 2 hervorgeht, hat auch Depot-Thrombozid in dreifacher Dosierung bei der Recalcifizierungszeit am Kaninchen gegenüber dem Liquemin-Depot eine deutlich schwächere Wirkung. Damit sind die Heparinoidpräparate auch in vivo im Tierversuch deutlich weniger wirksam als natürliches Heparin. Das Wirkungsverhältnis dürfte beim Kaninchen für Thrombozid bei $1/4$ bis $1/5$ des Heparins liegen.

Die Kurven sind zitiert aus HELLMANN (17) und MEYER (18)

STUDER-ENGELBERG-RANDALL (6) sowie HARDEGG-HARTERT (7) berücksichtigt, die schon nach wenigen Injektionen von 20 mg/kg Thrombozid beim Hund z.T. schwere toxische Veränderungen fanden, so muss man zu dem Schluss kommen, dass der therapeutischen Anwendung des Präparates beim Menschen äusserst enge Grenzen gesetzt sind (4, 5, 7). Kürzlich wurde unter dem Namen Elheparin⁺ ein neues teilsynthetisches Präparat auf den Markt gebracht. Es ist eine aus tierischem Gewebe isolierte Substanz, welche durch bestimmte Verfahren in ihrem Molekülaufbau so verändert wurde, dass sie in heparinähnlicher Weise wirken soll. MARX (3) spricht deshalb von einem "Heparinkörper", womit wohl angedeutet werden soll, dass es sich nicht um ein natürliches Heparin handelt, sondern um eine verwandte tierische Grundsubstanz, die durch synthetische Bearbeitung eine heparinähnliche Wirkung erhielt. Dieses neue Präparat wurde nach der Methode von STUDER-WINTERSTEIN (18) am Rinderplasma auf einen Antithrombintiter von 5000 IE/ccm Lösung, bzw. 100 IE/mg Trockensubstanz eingestellt. Nach den Einführungsarbeiten von KÖSTLER (19) und KAUTZSCH (20) soll dieses neue Präparat in klinischer Prüfung am Menschen brauchbare Ergebnisse gezeigt haben. Auch am Kaninchen soll es nach MARX (3) im chronischen Test mit täglich 10 mg/kg keine toxischen Schädigungen hervorrufen. HARDEGG-HARTERT (7) berichteten dagegen kürzlich über schwere toxische Schädigungen am Hund, die schon nach wenigen Tagen bei einer Dosierung von 20 mg/kg auftraten. Auch bei informativer Prüfung am Menschen kam es bei zwei Patienten schon nach einer Injektion einer therapeutischen Dosis Elheparin zu schweren subjektiven und objektiven Symptomen wie Schwindel, Zittern, Schweißausbruch und Atemnot, die zur Einstellung der in vivo Versuche am Menschen zwangen. Bei in vitro Untersuchungen im Thrombelastographen konnten sie, je nach Versuchsanordnung, für Elheparin eine Wirkungsstärke feststellen, welche nur ein Viertel bis ein Halb von der des Reinheparins betrug.

Auf Grund dieser widerspruchsvollen Versuchsergebnisse haben wir es unternommen, auf breiter Basis experimentell in vivo et in vitro zu dem Problem der Toxizität und biologischen Wirksamkeit der handelsüblichen Heparinoide im Vergleich zu den genuinen Heparinen Stellung zu nehmen.

⁺ Hersteller: Luitpoldwerk München

Getestet wurden verschiedene in Deutschland gebräuchliche Heparinpräparate, sowie die Heparinoide Thrombozid und Elheparin.

Für die physikochemischen Untersuchungen und die in vitro Gerinnungsteste kamen sämtliche Präparate in Form ihrer Trockensubstanz zur Anwendung. Die entsprechenden Substanzen wurden durch Fällung der Ampullenlösungen mit methyalkoholischer Natriumacetatlösung erhalten (siehe experimenteller Teil). Dies schien uns nötig, um die Wirkungsstärke der einzelnen Präparate genau ermitteln zu können und andererseits Chargendifferenzen möglichst auszuschalten. Für die in vivo Untersuchungen gelangten dagegen die handelsüblichen Ampullenlösungen zur Anwendung.

Auf Grund unserer Beobachtungen unterscheidet sich die von uns untersuchte Handelscharge Nr. 62 des Präparates Elheparin gegenüber den getesteten genuinen Heparinen hauptsächlich hinsichtlich seiner optischen Aktivität und seines hohen Schwefelgehaltes (siehe Tabelle 2). Während die natürlichen Heparine die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes nach rechts drehen, ist Elheparin linksdrehend und zwar um minus 17 Grad. Der Schwefelgehalt liegt um gut 3 % höher als bei den natürlichen Heparinen. Der Antithrombintiter am Rinderplasma liegt bei allen Heparinpräparaten und bei Elheparin über 100 IE/mg Trockensubstanz. (s. Tabelle 2)

Wie ausserdem aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die untersuchten Heparinpräparate kaum hinsichtlich Schwefelgehalt, optischer Aktivität und Viskosität. Dagegen ist zwischen den von uns ermittelten Ergebnissen für Elheparin und den von MARX (3) veröffentlichten hinsichtlich Schwefelgehalt und optischer Aktivität ein so grosser Unterschied, dass man als sicher annehmen kann, dass es sich bei den untersuchten Präparaten um Chargen handeln dürfte, welche sich in sehr wesentlichen Punkten unterscheiden. Während MARX (3) seine Untersuchungen zu einem Zeitpunkt anstellte, als das Präparat noch nicht im Handel war, arbeiteten wir mit einer Handelscharge.

Um genauere Einblicke in den Aufbau und die Zusammensetzung von Elheparin zu bekommen, wurde eine Fraktionierung des Präparates mittels Bariumacetat durchgeführt (Methode siehe experimenteller Teil).

Tabelle 2

Präparat	Viskosität 25 ^o , 1%ige Lösg.	Optische Aktivität	Schwefel- gehalt	Antithrom- bintiter
Elheparin Op. Nr. 62 (25 ^o , 2%ige Lösg.)	0,15	-17 ^o	15,9%	104 IE/mg
Elheparin MARX (3)	0,23	-12 ^o	12,9%	---
Thrombozid	---	-40 - -65 ^o (*)	ca. 15% (*)	32 IE/mg
Liguemin	0,17	+42 ^o	12,5%	105 IE/mg
Novo	0,14	+38 ^o	11,2%	102 IE/mg
Thrombophob	0,16	+38 ^o	10,2%	117 IE/mg
Vitrum	0,13	+39 ^o	12,5%	103 IE/mg
Chondroitinschwe- felsäure (36)	---	-25 ^o	5,3%	
ß-Heparin (35)	---	-60 ^o	6,4%	
Heparinmono- sulfosäure (36)	---	+74 ^o	5,9%	

(*) Laut Firmenprospekt der W. Bennd K.G., München

Es konnten drei Fraktionen erhalten werden. Die beiden ersten Fraktionen sind linksdrehend, die Fraktion III dagegen rechtsdrehend. Auch hier unterscheidet sich Elheparin gegenüber den untersuchten Heparinen, deren Fraktionen durchwegs Rechtsdrehung zeigten. (s. Tabelle 3)

Der Schwefelgehalt aller Elheparinfraktionen liegt über 10 %. Nicht ohne weiteres erklärbar ist die Differenz zwischen dem Schwefelgehalt des Aus-

Tabelle 3

Fraktionierung von Liquemin, Thrombophob und Elheparin mittels Bariumacetat nach der Methode von MARBET (30).

Präparat:	Liquemin		Thrombophob		Elheparin		
Fraktionen	I	II	I	II	I	II	III
Anteil der Ausgangssubstanz (%)	65%	35%	30%	70%	30%	65%	5%
Optische Aktivität	+48°	+23°	+46°	+37°	-8°	-18°	+30°
Schwefelgehalt (%)	--	--	--	--	12,9%	14,9%	13,0%

gangspräparates und der einzelnen Fraktionen. Vermutlich enthält das Ausgangspräparat anorganischen Schwefel, welcher bei der Fraktionierung ausfällt.

Da Heparine und Heparinoide saure Gruppen und dementsprechend eine starke elektrische Ladung besitzen, ist es möglich, die Wanderungsgeschwindigkeit ihrer einzelnen Komponenten elektrophoretisch zu untersuchen (BLASIUS-SEITZ 21). (GASTPAR-BLASIUS-SEITZ (4)) konnten mittels der Mikroelektrophorese nach ANTWEILER zeigen, dass das synthetische Thrombozid, wie auch alle Heparine, eine deutlich dreigestellte Wanderungsgruppe aufweisen. Während die Untergruppen beim Thrombozid jedoch homogen sind, zeigen die Nativheparine einen völlig inhomogenen Aufbau der Untergruppen, was darauf zurückzuführen ist, dass sie in Aufbau und Polymerisationsgrad unterschiedlich sind. Thrombozid dagegen dürfte eine einheitliche Grundsubstanz mit elek-

trisch verschieden stark geladenen sauren Gruppen besitzen. Wir haben unter den gleichen technischen Bedingungen und in der gleichen Apparatur nun auch Elheparin im elektrischen Feld wandern lassen und konnten auch für dieses Präparat eine dreigeteilte Fraktion ablesen, wobei die erste Untergruppe jedoch nur angedeutet ist. In etwa sind die Untergruppen grössenmässig mit den mit Bariumacetat gefällten Fraktionen vergleichbar. Elheparin zeigt im Gegensatz zu Thrombozid einen inhomogenen Aufbau wie die körpereigenen Heparine, was darauf hindeutet, dass es aus verschiedenen Grundkomponenten zusammengesetzt ist.

Zur Prüfung der gerinnungsphysiologischen Aktivität der Präparate wurde die Recalcifizierungszeit und Thrombinzeit und zwar jeweils am Menschenplasma und am Rinderplasma herangezogen. Ferner kam noch die Retraktionszeit des Gerinsels am Menschenplasma zur Anwendung. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Recalcifizierungszeit und Thrombinzeit jeweils in Form der prozentualen Gerinnungszeitverlängerungen aufgezeichnet. (s. Tabelle 4 und 5)

Wie aus obiger Tabelle hervorgeht, ist bei der Recalcifizierungszeit am Menschenplasma die gerinnungsphysiologische Wirkung von Elheparin $1/2$, die von Thrombozid nur $1/4$ so gross wie die des Präparates Lique-min. Gegenüber anderen, noch aktiveren Heparinpräparaten ist das Verhältnis noch ungünstiger. Bei der Thrombinzeit am Menschenplasma verhalten sich hinsichtlich ihrer Aktivität Thrombophob: Elheparin: Thrombozid wie $1 : 0,3 : 0,2$. Diese Befunde sind erstaunlich und sehr aufschlussreich, denn am Rinderplasma ist Elheparin hinsichtlich seines Antithrombintiters genau so aktiv wie die natürlichen Heparine. Für Thrombozid liess sich auch am Rinderplasma nur ein Antithrombintiter von ca. 30 IE/mg errechnen.

Zur Prüfung der Wirkung der Präparate auf die Thrombozyten und damit auf die Retraktion des gebildeten Gerinsels zogen wir den Retraktionstest nach FONIO (22) heran. Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Heparinoide Elheparin und Thrombozid in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{g}/\text{ccm}$ Ansatz keinerlei Einfluss auf die Retraktion hatten. Die untersuchten Heparinpräparate Lique-min, Novo, Thrombophob und Vitrum ergaben

Tabelle 4

Gerinnungshemmende Wirkung verschiedener Heparine und Heparinoide gemessen mit der Recalcifizierungszeit am Menschen-, bzw. Rinderplasma.

Präparat Gerinnungszeitverlängerung in % (Ausgangswert = 100 %)

	<u>Menschenplasma</u>			<u>Rinderplasma</u>		
	Dosis /ml			Dosis /ml		
	5	10	20	5	10	20
<u>Heparine:</u>						
Liquemin	150%	263%	620%	164%	371%	---
Novo	164%	---	---	193%	---	---
Thrombophob	180%	---	---	268%	---	---
Vitrum	153%	---	---	176%	---	---
<u>Heparinoide:</u>						
Elheparin	---	172%	---	145%	----	---
Thrombozid	---	---	152%	---	131%	---
Treburon (*)	---	---	173%	---	139%	---

(*) Nicht im Handel

Tabelle 5

Gerinnungshemmende Wirkung verschiedener Heparine und Heparinoide gemessen mit der Thrombinzeit am Menschen-, bzw. Rinderplasma.

Präparat	<u>Menschenplasma</u>			<u>Rinderplasma</u>		
	Dosis / ml			Dosis / ml		
	5	10	20	5	10	20
<u>Heparine:</u>						
Liquemin	223%	792%	---	246%	625%	---
Novo	257%	---	---	255%	---	---
Thromphob	350%	---	---	328%	---	---
Vitrum	245%	---	---	265%	---	---
<u>Heparinoide:</u>						
Elheparin	---	213%	---	238%	---	---
Thrombozid	---	138%	---	---	---	215%
Treburon (✱)	---	168%	---	---	---	321%

jedoch in gleicher Dosierung eine starke Retraktionshemmung und zeigten noch nach einer Stunde einen vollkommenen "Haemophilierungseffekt" des Serums. Auch in einer Dosierung von 50 γ /ccm konnte mit Elheparin und Thrombozid keinerlei Retraktionshemmung erzielt werden. Beide Präparate zeigen demnach im Gegensatz zu den Heparinen keinen stabilisierenden Effekt auf die Thrombocyten und wirken daher auch nicht reaktionshemmend, es fehlen ihnen also zwei wesentliche Wirkungen auf das Blutgerinnungssystem.

Um die biologische Wirkungsstärke der Präparate zu untersuchen, bedienten wir uns des Myotoxin-Thrombokinase-Testes nach GOOSSENS (23),

bei welchem es sich um einen biologischen Thromboembolienmodellversuch handelt. Mit diesem Test kann die thromboembolieverhütende Wirkung von Antikoagulantien qualitativ und weitgehend quantitativ getestet werden. GOOSENS (14) hat bereits vor 3 Jahren Thrombozid mit dieser Methode auf seine antikoagulierende Wirkung untersucht und festgestellt, dass man im Vergleich zu Heparin von Thrombozid etwa die fünffache Menge benötigt, um einen sicheren Thromboembolieschutz beim Versuchstier zu erzeugen. Jetzt fanden wir für Elheparin in informativen Untersuchungen an fünf Tieren, dass man dieses Präparat mindestens um ein Drittel höher dosieren muss als Heparin, um eine gleich starke Wirkung zu erzielen. Dies ist bemerkenswert, da Elheparin bei den *in vitro* Testen am menschlichen Plasma eine geringere gerinnungsphysiologische Aktivität ergab, die je nach Test ein Halb bis ein Viertel der Aktivität der Heparine betrug. Falls diese Versuchsergebnisse vom Kaninchen auf die Verhältnisse am Menschen übertragbar sind, würde dies bedeuten, dass Elheparin eine höhere biologische Aktivität besitzt, als auf Grund der *in vitro* Teste zu erwarten wäre.

Nachdem STUDER-ENGELBERG-RANDALL (6) sowie HARDEGG-HARTERT (7) bereits über eine hohe Toxizität von Thrombozid am Hund berichteten, und HARDEGG-HARTERT (7) auch für Elheparin am Hund schwere toxische Veränderungen verifizieren konnten, haben wir Toxizitätsprüfungen mit Thrombozid und Elheparin am Kaninchen angestellt. Nach früheren Untersuchungen verschiedener Autoren soll Thrombozid am Kaninchen in therapeutischer Dosierung nicht toxisch wirken. Auch mit Elheparin konnte MARX (3) in einer Dosierung von 10mg/kg am Kaninchen keine toxischen Veränderungen nachweisen. Wir haben auf Grund unserer Ergebnisse bei den *in vitro* Untersuchungen eine tägliche Dosierung von 40mg/kg gewählt. 2 Tiere wurden mit täglich 40 mg/kg Liquemin, 3 Tiere mit täglich 40 mg/kg Thrombozid und 3 Tiere mit täglich 40 mg/kg Elheparin behandelt.

Die Liquemintiere wurden nach 16 Injektionen 20 Tage nach Versuchsbeginn in gutem Allgemeinzustand getötet. Makroskopisch konnten keinerlei pathologische Erscheinungen nachgewiesen werden. Auch histologisch fanden sich an Lunge, Leber, Milz, Niere, Nebenniere und Darm keine pathologischen Veränderungen.

Von den Thrombozid-Tieren starb ein Tier schon nach der zweiten Injektion unter akuten, schockähnlichen Erscheinungen. Der Sektionsbefund gab makroskopisch keinen Anhalt für Blutungen in Gewebe, inneren Organen oder dem Magen-Darm-Trakt. Ein zweites Tier verendete nach neun Injektionen 11 Tage nach Versuchsbeginn. Es wies eine Gewichtsabnahme von 10 % auf. Der Sektionsbefund ergab keine Hinweise auf die Todesursache. Eine Blutung konnte nicht festgestellt werden. - Das dritte Tier wurde nach 16 Injektionen 20 Tage nach Versuchsbeginn in stark reduziertem Allgemeinzustand mit einem Gewichtsverlust von 15 % durch Genickschlag getötet. Der Sektionsbefund war nicht typisch. Auch hier keine Blutungen. Histologisch fand sich bei allen mit 40 mg/kg Thrombozid behandelten Tieren eine schwere toxische Leberschädigung mit ausgehentner Dissoziation der Trabekel, Vakuolenbildung im Protoplasma, fleckförmigen Nekrosen der Zellen, sowie Pigmentablagerung im Parenchym. Ausserdem konnte überall eine starke Hyperaemie der Gefässe und Kapillaren nachgewiesen werden. Besonders schwere Schädigungen zeigte das Organ bei dem Tier, welches 16 Injektionen bekommen hatte. Auch an der Niere konnten schwere toxisch-degenerative Veränderungen nachgewiesen werden. Vor allem der Tubulusapparat wies von trüber Schwellung bis zum vollkommenen Untergang der Zellen alle Schattierungen der Zerstörung auf. Die Glomeruli zeigten starke Hyperaemie, waren jedoch teilweise auch schon in Untergang begriffen. Vergleichsweise gering waren die Veränderungen an Milz, Nebenniere und Darm, wo höchstens eine Hyperaemie nachweisbar war.

Von den mit Elheparin behandelten Tieren starben zwei nach der sechsten Injektion, 8 Tage nach Versuchsbeginn. Bei der Sektion fanden sich, von kleineren flächenhaften Blutungen in das subakute Gewebe des Halsbereiches abgesehen, keine grösseren Blutungen. Das dritte Tier wurde nach 16 Elheparininjektionen zu je 40 mg/kg 20 Tage nach Versuchsbeginn in stark reduziertem Allgemeinzustand und einem Gewichtsverlust von 15 % durch Genickschlag getötet. Makroskopisch war kein wesentlicher pathologischer Befund zu erheben. Histologisch fanden sich bei den mit 40 mg/kg Elheparin behandelten Tieren in der Leber alle Stadien der toxischen Schädigung von Quellung und Dissoziation der Trabekel, Entmischung des Protoplasmas, zentraler Verfettung bis zu fleckförmigen Nekrosen der Zellen. Auch hier wies das Tier mit den meisten Injektionen

die schwersten Veränderungen auf. An den Nieren war der Hauptbefund am Tubulusapparat zu erheben. Es fand sich stets eine starke trübe Schwellung der Tubuli contorti mit teilweise fleckförmiger Verfettung und Ablösung der Epithelien. Der Glomerulusapparat war dagegen kaum verändert. An Darm, Nebenniere und Milz fanden sich keine nennenswerten Schädigungen, mit Ausnahme einer oft stärkeren Hyperaemie der Gefäße und Kapillaren.

Bei der Toxizitätsprüfung am Kaninchen konnten bei einer Dosierung von täglich 40 mg/kg demnach mit den Präparaten Thrombozid und Elheparin so schwere Schädigungen verifiziert werden, dass zwei Drittel der Tiere schon nach wenigen Injektionen ad exitum kamen. Die unmittelbare Todesursache konnte nicht ermittelt, eine Blutung als Ursache jedoch in allen Fällen ausgeschlossen werden. Der Hauptbefund bei der histologischen Untersuchung konnte an Leber und Niere erhoben werden. Diese beiden Organe zeigten bei *a l l e n* Tieren das Bild einer schweren toxischen Schädigung. Die Befunde an Darm, Milz und Nebenniere waren nur unwesentlich. Dies ist erwähnenswert, da unsere Voruntersucher (6, 7) beim Hund gerade am Darm z.T. schwerste toxische Veränderungen nachweisen konnten. Die Tiere, welche mit dem Heparinpräparat Liquemin behandelt wurden, zeigten dagegen gutes Allgemeinbefinden. Ihre Organe wiesen bei der histopathologischen Untersuchung keinerlei toxische Veränderungen auf. Bezüglich der von uns verwendeten Dosis von 40 mg/kg wäre zu sagen, dass dies für Thrombozid bei Berücksichtigung seiner Aktivität höchstens das Doppelte einer ausreichenden therapeutischen Dosis ausmacht. Für Elheparin würde sich analogerweise das 3 bis 4 fache, für Heparin das 4 bis 6 fache errechnen. Um nun zu prüfen, bis zu welcher Dosierung die Heparinoide Thrombozid und Elheparin am Kaninchen nachweisbar toxische Veränderungen hervorrufen, stellten wir eine zweite Versuchsreihe an. Für Thrombozid (3 Tiere) und Elheparin (5 Tiere) wurde die Dosis auf die Hälfte verringert (20 mg/kg), für Heparin (2 Tiere) wurde dagegen die Dosierung von 40 mg/kg beibehalten, wobei diesmal das Heparinpräparat Thrombovetren zur Anwendung kam. Die zwei mit dem Heparinpräparat Thrombovetren behandelten Tiere wurden nach 32 Injektionen zu 40 mg/kg 42 Tage nach Versuchsbeginn in gutem Allgemeinzustand durch Genickschlag getötet. Weder makroskopisch noch mikroskopisch konnte ein nennenswerter pathologischer Befund erhoben werden.

Von den 3 Thrombozidtieren wurde eines nach 11 Injektionen in gutem Allgemeinzustand wegen Ohrträude getötet. Ein zweites Tier wurde nach 18 Injektionen in stark reduziertem Allgemeinzustand und einem Gewichtsverlust von 15 %, das dritte Tier nach 21 Injektionen ebenfalls in reduziertem Allgemeinzustand und einem Gewichtsverlust von 10 % getötet. Histologisch fanden sich bei den beiden letzten Tieren an der Leber eine acino-zentrale Dissoziation der Trabekel mit geringgradiger, feintropfiger Verfettung sowie fleckförmiger Vakuolenbildung im Protoplasma, ausserdem eine starke Hyperaemie der Kapillaren. Die Niere wies dagegen ungleich stärkere Veränderungen auf. Der Tubulusapparat zeigte alle Stadien der Zerstörung und auch die Glomeruli waren teilweise schon in Untergang begriffen. Nur Leber und Niere des ersten Tieres wiesen keine wesentlichen Veränderungen auf.

Von den fünf mit Elheparin behandelten Tieren starben zwei Tiere nach 5 bzw. 16 Injektionen an einer starken Blutung, ein drittes Tier starb nach 17 Injektionen an schockähnlichen Erscheinungen. Die beiden restlichen Tiere mussten in stark reduziertem Allgemeinzustand nach 12 bzw. 20 Injektionen und einem Gewichtsverlust von 10 bzw. 20 % kurz vor dem Exitus letalis getötet werden. Makroskopisch konnte kein wesentlich pathologischer Befund erhoben werden. Histologisch fanden sich - mit Ausnahme des ersten Tieres, welches an einer starken Blutung verendete - bei allen Elheparintieren teilweise schwerste degenerative Schädigungen an Leber und Niere, wie sie schon weiter oben beschrieben worden sind. Besonders stark in Mitleidenschaft gezogen war der Tubulusapparat und hier besonders die Tubuli contorti I. Ordnung, während die Glomeruli noch weitgehend erhalten und funktionstüchtig waren. (Siehe genaue histopathologische Protokolle im experimentellen Teil, sowie Tabelle 5) (s. Tabelle 6)

Wie aus der Toxizitätsprüfung mit 20 mg/kg zu ersehen ist, wirken die Heparinoide Thrombozid und Elheparin auch in dieser Konzentration am Kaninchen schwer toxisch. Bei Berücksichtigung der gerinnungsphysiologischen Aktivität stellt 20 mg/kg jedoch für Thrombozid die "therapeutische Dosis" und für Elheparin das Eineinhalb bis Zweifache derselben dar. Demgegenüber werden von Heparin 40 mg/kg über lange Zeit ohne Schaden toleriert, was in Relation zu seiner Aktivität dem 4 bis 6 fachen seiner therapeutischen Dosierung entspricht.

Tabelle 6

Nr. Präparat	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Injektionen	Gesamt- dosierung (mg/kg)	Gewichts- verlust (%)	Verlauf
496 Liquemin	40	16	640	---	Guter A.Z. Makroskop. O. B.
498 Liquemin	40	16	640	---	idem
556 Thrombovetren	40	30	1200	---	idem
557 Thrombovetren	40	30	1200	---	idem
503 Thrombozid	40	9	360	---	Exitus
504 Thrombozid	40	2	80	---	Exitus
505 Thrombozid	40	16	640	15%	Schwer reduz. A.Z.
558 Thrombozid	20	18	360	15%	Reduz. A.Z.
559 Thrombozid	20	11	220	5%	Guter A.Z. We- gen Ohrräude getötet
560 Thrombozid	20	21	420	10%	Reduz. A.Z.
499 Elheparin	40	16	640	15%	Schwer reduz. A.Z.
501 Elheparin	40	9	240	10%	Exitus
502 Elheparin	40	9	240	10%	Exitus
458 Elheparin	20	12	240	15%	Schwer reduz. A.Z.
561 Elheparin	20	5	100	---	Guter A.Z. Verblutet!
562 Elheparin	20	20	400	20%	Schwer reduz. A.Z.
563 Elheparin	20	16	320	10%	Reduz. A.Z. Verblutet!
564 Elheparin	20	17	340	15%	Exitus

Diskussion

Die Zusammenfassung unserer Versuchsergebnisse ergibt in Verbindung mit den Arbeiten anderer Autoren folgendes:

1. Die Heparinersatzmittel "Thrombozid" und "Elheparin" wirken im Gegensatz zu den getesteten genuinen Heparinen nicht nur am Hund (STUDER-ENGELBERG-RANDALL 6, HARDEGG-HARTERT 7) sondern auch am Kaninchen sehr toxisch, sodass bei einer Dosierung von 40 mg/kg zwei Drittel der Tiere schon nach wenigen Injektionen ad exitum kamen. Aber auch in einer Dosierung von 20 mg/kg zeigten sich so schwere Veränderungen, dass einige Tiere kurz vor Verenden in schwer reduziertem Allgemeinzustand getötet werden mussten. Die unmittelbare Todesursache konnte nicht ermittelt, eine Blutung als solche jedoch mit Ausnahme von zwei Fällen ausgeschlossen werden. Der Hauptbefund bei der histologischen Untersuchung konnte an Leber und Niere erhoben werden. Diese beiden Organe zeigten bei allen Tieren - auch bei den Überlebenden - das Bild einer schweren toxischen Schädigung. Die Befunde an Darm, Milz und Nebenniere traten dagegen in den Hintergrund. Dies scheint erwähnenswert, da unsere Voruntersucher am Hund gerade am Darm schwere toxische Veränderungen nachweisen konnten. Die Befunde der von uns durchgeführten Toxizitätsprüfungen stehen in gewissem Widerspruch zu früheren Untersuchungen, in welchen festgestellt wurde, dass Thrombozid und Elheparin am Kaninchen keine Schädigungen hervorrufen. Wie wir jedoch zeigen konnten ist dies nur eine Frage der Dosis. Die Dosis ihrerseits richtet sich nach der gerinnungsphysiologischen Aktivität der Präparate, oder sollte sich zumindest danach richten. In der Frage der "therapeutischen Dosierung" gehen die Ansichten der Untersucher jedoch weitgehend auseinander, weil die angewandten Untersuchungsmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.
2. Bei den in vitro Gerinnungstesten am Menschenplasma ergaben die Heparinoide Elheparin und Thrombozid gegenüber Heparin eine

erheblich schwächere Aktivität: Im Retraktionstest nach FONIO (22) zeigen die Präparate, selbst in sehr hoher Dosierung, keinerlei Wirkung, bei der Recalcifizierungszeit ist Thrombozid $1/4$, Elheparin etwa $1/2$ so wirksam wie Heparin. Bei der Thrombinzeit beträgt die Aktivität des Thrombozid nur $1/5$ die des Elheparin ca. $1/3$ der natürlichen Heparine. HARTERT (7) konnte im Thrombelastogramm - je nach Versuchsanordnung - für Elheparin eine Aktivität gegenüber den Reinheparinen von 25 - 50 % messen, für Thrombozid noch bedeutend weniger. Interessant ist dagegen, dass Elheparin im Rinderplasma mit der Methode STUDER-WINTERSTEIN (18) einen Antithrombintiter von 104 IE/mg ergibt. Am Rinderplasma besitzt das Präparat also eine genau so grosse Aktivität wie die Handelsheparine. Für Thrombozid konnte auch am Rinderplasma nur ein Antithrombintiter von 32 IE/mg ermittelt werden.

3. Im biologischen Thromboemboliemodellversuch (MTT nach GOOSSENS 23) benötigten wir von Elheparin rund ein Drittel mehr als von Heparin, um einen sicheren Thromboembolieschutz beim Versuchstier zu erzeugen. Falls diese Versuchsergebnisse vom Kaninchen auf die Verhältnisse beim Menschen übertragbar sind, würde dies bedeuten, dass Elheparin eine höhere biologische Aktivität besitzt, als auf Grund der gerinnungsphysiologischen in vitro Tests zu erwarten wäre. Für Thrombozid konnte GOOSSENS (14) zeigen, dass man etwa die fünffache Menge gegenüber Heparin benötigt, um das Versuchstier vor einer tödlichen Thromboembolie zu schützen. Wir haben die Versuche nicht wiederholt, konnten jedoch feststellen, dass die doppelte Menge Thrombozid beim Tier keinerlei thromboembolieverhütende Wirkung besitzt.
4. Elheparin, welches in der Literatur als "Heparinkörper" (3) bezeichnet wird, weicht chemisch hinsichtlich optischer Aktivität und Schwefelgehalt erheblich von den natürlichen Heparinen ab. Während die Nativheparine durchwegs rechtsdrehend sind, weist Elheparin Linksdrehung auf (-17°). Der Schwefelgehalt liegt, zumindest bei der von uns untersuchten Charge,

um gut nominal 3 % höher als bei den natürlichen Heparinen. Auch bei der Fraktionierung konnte keinerlei Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Heparinpräparaten und Elheparin gefunden werden. In allen drei Elheparinfraktionen, welche sich grössenordnungsweise mit dem Elektrophoresediagramm decken, liegt der Schwefelgehalt über 10 %, ist jedoch niedriger als in der Ausgangssubstanz. Vermutlich enthält das Präparat anorganischen, nicht gebundenen Schwefel, welcher bei der Fraktionierung ausfällt. Die beiden ersten Fraktionen sind linksdrehend, Fraktion III dagegen rechtsdrehend. Wir nehmen an, dass es sich bei dem Präparat Elheparin um ein Gemisch sulfurierter Chondroitinschwefelsäuren und sulfurierter Heparinmonosulfursäure (Fraktion III) handelt. Diese Annahme wird gestützt durch papierchromatographische Untersuchungen von AMANN (24). Bezüglich des sehr hohen Sulfurierungsgrades ist zu bemerken, dass STUDER-ZBINDEN (25) feststellen konnten, dass künstlich aufsulfuriertes Reinheparin am Hund dieselben toxischen Veränderungen hervorruft, wie die bekannten Heparinoide.

5. HUSEMANN und Ma. (26) kommen auf Grund ihrer ausführlichen Untersuchungen mit Xylanpolyschwefelsäureestern verschiedener Molekülgrösse und Substitutionsgrades zu dem Schluss, dass es bis heute nicht gelang, ein Präparat mit optimaler Wirksamkeit und Verträglichkeit auf Xylanbasis herzustellen. Der einzige Stoff, dem dieses Prädikat zukommt, ist das natürliche Heparin. Vielleicht hängt seine gute Verträglichkeit und verhältnismässig schnelle Ausscheidung mit dem spezifischen Leberferment Heparinase zusammen (JAQUES 27), welches Heparin schnell abzubauen vermag (MARBET-WINTERSTEIN 28). Vielleicht ist auch die Art der Bindung der Grundbausteine von Wichtigkeit oder eine bestimmte Verteilung und sterische Anordnung der Sulfogruppen bzw. deren Bindung an die Aminogruppe des Glucosaminrestes (26). Die Xylane dagegen zeigen alle proportional ihres Substitutions- und Sulfurierungsgrades Speicherung und Kummulierung, während sich ihre Wirkungsstärke und Wirkungsdauer umgekehrt proportional dazu verhält. Bei dem Präparat Thrombozid wurde offenbar, um den Speicherungsgrad kleiner zu halten, eine geringere Wirksamkeit in Kauf genommen. Da

die Wirksamkeit aber klein ist, benötigt man grössere Mengen, um einen ausreichenden therapeutischen Effekt zu erzielen. Damit nimmt die Toxizität aber wieder zu, die therapeutische Breite demnach ab.

Für das Präparat Elheparin liegen die Verhältnisse nicht so einfach. Hier handelt es sich um ein Gemisch verschiedener, anscheinend tierischer Grundsubstanzen, die noch nicht genau definiert werden konnten und auch von der Herstellerfirma nicht bekannt gegeben werden. Hinsichtlich seiner Eigenschaften und seiner toxischen Wirkung am Versuchstier kann es jedoch keinen Zweifel geben, dass Elheparin zu den Heparinoiden zählt. Der Name "Elheparin" und seine Bezeichnung als "Heparinkörper" erscheint uns daher verwirrend und irreführend.

6. Bei der Beurteilung der toxischen Schädigungen an den Versuchstieren durch die untersuchten Heparinoide muss noch berücksichtigt werden, dass sie an gesunden - also widerstandsfähigen - Tieren hervorgerufen wurden. Die therapeutische Anwendung beim Menschen erfolgt jedoch in der Regel an kranken, also vorbelasteten, Organismen, deren Toleranz herabgesetzt ist. Aber selbst wenn man annehmen will, dass die Toxizitätsversuche am Tier nur cum grano salis auf den Menschen und die in der Humantherapie üblichen Dosen übertragbar sind, können wir vor einer kritiklosen Verwendung dieser Präparate nur warnen. Auch SEITZ-GASTPAR-GOOSENS (5, 29) sowie KOLER (30) u. a. lehnen die Heparinoide für die Antikoagulantientherapie auf Grund ihrer Untersuchungen und Erfahrungen ab.
7. Wir haben zu dem Problem der gegenseitigen Beziehung zwischen Wirksamkeit und Toxizität bei Heparinen und Heparinoiden so ausführlich Stellung genommen, da die synthetischen Heparinersatzmittel immer wieder - trotz Warnung mancher berufener Autoren - als völlig unschädlich angepriesen werden und auf Grund ihres relativ niedrigen Preises von vielen Klinikern und Praktikern - oft in Unkenntnis ihrer Nebenwirkungen und Wirkungsstärke - häufig angewandt werden. Es konnte gezeigt wer-

den, dass diese Präparate, wenn sie in ausreichender Menge dosiert werden - sie werden tatsächlich auf Grund von nicht immer zuverlässigen Firmenprospekten in vielen Fällen unterdosiert -, teilweise schwere Schädigungen hervorrufen können, die bestimmt z. T. irreversibel sind. Werden sie jedoch unterdosiert, so kann kein ausreichender antikoagulierender Effekt erwartet werden, und die Folgen bei Thrombose und Embolie können deletärer Natur sein.

EXPERIMENTELLER TEIL

- I. Herstellung der Trockensubstanz der Präparate nach MARBET (36).
 20 ml Ampullenlösung des entsprechenden Präparates werden mit 200 ml einer 10%igen alkoholischen Natrium-Acetat-Lösung gefällt. Nach Abzentrifugierung wird der Niederschlag 2 mal mit Alkohol und Aether gewaschen. Trocknen während 4 Stunden bei 90°.
- II. In vitro Gerinnungsteste am Menschen- bzw. Rinderplasma.
 Geprüfte Substanzen:
 Nativheparine: Liquemin, Novo, Thrombophob, Vitrum.
 Heparinoide: Elheparin, Thrombozid, Treburon (nicht im Handel).
- Methoden:
1. Recalcifizierungszeit nach HOWELL (31).
 Reagenzien: Calciumchlorid-Lösung 0,6 %,

Die Trockensubstanz der verschiedenen Präparate wird jeweils in γ /ml in die Calciumchloridlösung eingewogen.

 0,2 ml Citratplasma wurden im Wasserbad von 37° 3 Minuten vorgewärmt, dann 0,2 γ /ml der obigen Calciumchloridlösung mit den eingewogenen Versuchschargen mit der Pipette eingeblasen und die Stoppuhr in Gang gesetzt. Eine Platinöse wurde in rhythmischen Abständen (1 mal pro Sek.) durch das Gemisch gezogen, bis ein Gerinnsel hängen blieb (Ende der Gerinnung). Dieser Zeitpunkt wurde gestoppt. - Es wurden stets 5 Parallelbestimmungen ausgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Ebenso wurde von obigem Testplasma mit reinem Calciumchlorid die Gerinnungszeit an 5 Parallelbestimmungen getestet und daraus der Mittelwert errechnet. Dieser Wert wurde als Null-Wert genommen. Die mit den verschiedenen Heparin- bzw. Heparinoid-Präparaten erzielten Gerinnungszeiten wurden hierzu in Beziehung gebracht. Ergebnisse siehe Tabelle 4, Seite 19.

2. Thrombinzeit nach JÜRGENS (32).

Reagenzien: Testthrombin "Behring" (60 NIH/Einh).

Aqua destillata.

Eine Ampulle Testthrombin wurde in 1 ml Aqua dest. gelöst und kurz vor Versuch weiter auf 1 : 10 verdünnt (1 ml Thrombinlösung + 9 ml Aqua dest.). Die zu prüfenden Trockensubstanzen der betreffenden Heparin- bzw. Heparinoidpräparate wurden in μ / ml dieser Thrombinlösung eingewogen. - 0,1 ml Plasma und 0,1 ml Aqua dest. wurden in ein Glasröhrchen pipettiert, dasselbe bei 37° im Wasserbad 3 Minuten vorgewärmt. Sodann wurde 0,1 ml der Thrombinlösung, welche die bereits zu testende Substanz enthielt, hinzupipettiert und die Gerinnungszeit gestoppt. 5 Parallelbestimmungen. In analoger Weise wurde mit reiner Thrombinlösung die Gerinnungszeit bestimmt. Dieser Wert galt als Null-Wert, die anderen Werte wurden dazu in Beziehung gebracht.

Ergebnisse Siehe Tabelle 5, Seite 20.

3. Retraktionstest nach FONIO (22) am Menschen-Citratplasma.

Menschliches Citratplasma wird über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Das überstehende plättchenhaltige Plasma wird abgehoben und während der Bestimmung in Eis aufgehoben. Wird 1 ml dieses Plasmas mit 0,1 ml m/4 Calciumchlorid recalcifiziert, so tritt in einigen Minuten die Gerinnung ein. Nach kurzer Zeit zieht sich das Gerinnsel nach dem oberen Flüssigkeitsdiscus zusammen. Die physiologischen Retraktivitätswerte betragen je nach Reagensglasdurchmesser ca. 8 (+ 2) mm. Die zu untersuchenden Heparin- bzw. Heparinoidpräparate werden in Form ihrer Trockensubstanz in geeigneter Konzentration in der zur Recalcifizierung verwendeten Calciumchloridlösung gelöst.

Für die Bestimmung werden neue (nicht gebrauchte), ausgeglühte Reagensglasröhrchen von ca. 8 mm Durchmesser verwendet. Die Röhrchen bleiben nach Gerinnungseintritt 30 Minuten bei 37° stehen.

Es handelt sich bei dieser Methode um einen qualitativen Retraktionstest. Da die Unterschiede zwischen den Heparinen und Heparinoiden aber in diesem Test so eindeutig sind, kann auf die

quantitative Bestimmung der Retraktionsvalenz verzichtet werden.

Ergebnisse siehe Text Seite 21.

III. Myotoxin-Thrombokinasetest (MTT) nach GOOSSENS(23) am Kaninchen.

In diesem biologischen Thromboemboliemodellversuch wird durch Kombination allein unterschwelliger Dosen einer depressorisch wirkenden Substanz (Myotoxin) mit einem Gerinnungsaktivator (Thrombokinase) bei intravenöser Injektion am Versuchstier eine letale Thromboembolie hervorgerufen. Diese Embolie kann durch Antikoagulantien verhindert werden. Wenn eine exakte Einstellung der Versuchsreihen durch stabiles Ausgangsmaterial und genaue Dosierung pro kg Versuchstier gewährleistet ist, sind quantitative Ergebnisse möglich umso mehr, als bei 100 % der Kontrollen eine letale Thromboembolie Vorbedingung ist.

Geprüfte Substanzen; Liquemin, Elheparin, Thrombozid.

Ergebnisse siehe Tabelle 7.

Tabelle 7

Injiz. Dosis mg/kg	Liquemin	Elheparin	Thrombozid
20	--	--	o.B.
10	--	--	schwerer Schock (Schwellenwert)
6	--	o.B.	ex.
6	o.B.	o.B.	ex.
5	o.B.	o.B.	--
4	--	o.B.	--
4	--	o.B.	--
3	o.B.	ex.	--
3	o.B.	ex.	--
3	o.B.	ex.	--

IV. Physiko-chemische Untersuchungen.

1. Optische Aktivität.

Bestimmung durch Messung der Drehung einer 1%igen wässrigen Lösung der betreffenden Substanz im 1 dm/Rohr.

2. Viskosität.

Bestimmung der Durchflusszeit von 3,5 ml einer 1%igen Lösung des betreffenden Präparates in 0,5 n NaCl bei 25° im Viskosimeter nach OSTWALD (Kapillardicke 0,4 mm, Kapillarlänge 120 mm).

3. Schwefelgehalt (Methode der Dr. Wander-A.G. (33)).

Etwa 400 mg Trockensubstanz des betreffenden Präparates werden eingewogen und in ein Schliffkölbchen von 100 ml gebracht. Man übergiesst mit 10 ml 30% Perhydrol (p.a. sulfatfrei) und gibt 0,5 ml konzentrierte Salzsäure hinzu. Mit aufgesetztem Steigrohr wird der Kolben 60 Minuten im siedenden Wasserbad gehalten und nach dieser Zeit 5 ml Perhydrol zugegeben. Nach insgesamt 90 Minuten lässt man abkühlen, spült die Lösung in ein Becherglas über und verdünnt auf 300 ml mit heissem Aqua dest.. Man erhitzt kurze Zeit bis zum gelinden Sieden, um die Hauptmenge des überschüssigen Perhydrol zu vertreiben und fällt bei Siedehitze langsam und tropfenweise mit 4,6 ml 1-n Bariumchloridlösung. Der Ansatz bleibt 90 - 120 Minuten unter gelegentlichem Umrühren bei 60° stehen. Noch warm wird filtriert und der Bariumsulfatniederschlag in üblicher Weise geglüht und gewogen.

Berechnung: %S = 13,71 ■

Bariumsulfat - Auswaage

Heparin-, bzw. Heparinoid-Einwaage

Gleichzeitig wird von der lufttrockenen Substanz eine Wasserbestimmung durch Trocknen über Phosphorpentoxyd bei 100° im Vakuum ausgeführt und der gefundene Feuchtigkeitsgehalt in Rechnung gesetzt.

4. Antithrombintiter am Rinderplasma nach STUDER-WINTERSTEIN (18).

Am Rinderplasma wird mit einem Standardheparin in steigender Konzentration mittels der Thrombinzeit eine Aktivitätseichkurve ermittelt. Unter gleichen Bedingungen wird dann dass zu untersu-

chende Heparin- bzw. Heparinoidpräparat am gleichen Rinderplasma auf seine gerinnungsverzögernde Wirkung getestet. Aus der ermittelten Zeit kann die Aktivität des zu bestimmenden Präparates an Hand der Eichkurve ermittelt werden.

Berechnung: Aktivität x = $\frac{\text{gefundener Heparinwert (mg)} \cdot \text{Aktivität Standardheparin}}{\text{Einwaage Präparat (mg/ml)}}$

5. Fraktionierung der Präparate mittels Bariumacetat nach MARBET (36).

1 g Trockensubstanz des betreffenden Präparates wird in 10 ml Aqua dest. gelöst und diese Lösung mit 20 ml einer 20%igen Bariumacetatlösung versetzt. Kühlung während einer Stunde mit Eis, dann Abzentrifugierung des Niederschlages. Einmaliges Waschen mit 10%iger Bariumacetatlösung. Dann Aufarbeitung des Niederschlages mit Soda und Ausfällung des Präparates aus der essigsauren Lösung durch Methanol (Fraktion I). Die Mutterlauge wird mit Methanol bis zu einer Konzentration von 18% versetzt, wobei wiederum ein Niederschlag auftritt, der in obiger Weise aufgearbeitet wird (Fraktion II). Aus der Mutterlauge der Fraktion II kann durch Erhöhung der Methanolkonzentration auf 35% eine Fraktion III gewonnen werden, welche in üblicher Weise aufgearbeitet wird.

Verzichtet man auf eine Auftrennung in eine II. und III. Fraktion, so wird die Mutterlauge der I. Fraktion sofort mit 1/3 des Volumens Methanol versetzt und der Niederschlag in üblicher Weise aufgearbeitet. Die so erhaltene Fraktion setzt sich dann aus Fraktion II und III zusammen.

Geprüfte Substanzen: Elheparin (Auftrennung in 3 Fraktionen), Liquemin und Thrombophob (Auftrennung in 2 Fraktionen).

Ergebnisse siehe Tabelle 3, Seite 17.

6. Mikro-Elektrophorese nach ANTWEILER (34).

Versuchsbedingungen: Dialyse 2 Stunden gegen Dole-Puffer $\text{ph} = 8,6$. Ionenstärke 0,12. Wanderungszeit 10 Minuten. Spannung 55/60 Volt, Stromstärke 1,5 Ampere. Temperatur $10,5^{\circ}$.

Geprüfte Substanzen: Elheparin.

(Ergebnis siehe Text Seite 18. Auf eine Abbildung des Kurvenbildes muss hier aus technischen Gründen verzichtet werden). Die Kurvenbilder der anderen Präparate sind bei GASTPAR-BLASIUS-SEITZ (4) veröffentlicht.

V. Prüfung der chronischen Toxizität am Kaninchen.

Geprüfte Präparate: Liquemin, Thrombovetren, Elheparin, Thrombozid. Versuchsdauer und Einzelheiten der beiden Versuchsreihen mit täglich 40 mg/kg und 20 mg/kg siehe im Text und Tabelle 6, Seite 25. Die histopathologische Untersuchung der Organe Leber, Milz, Niere und Nebenniere erfolgt an Haematoxylin- Eosin gefärbten Schnittserien. Für bestimmte Differenzierungen wurden nach Van GIESON und Sudan gefärbte Präparate herangezogen.

Liquemin.

Hase Nr. 496. 16 Injektionen à 40 mg/kg. Tier wurde am Tage nach der letzten Injektion bei gutem Allgemeinzustand durch Genickschlag getötet.

Lunge: Starke Plasmazellinfiltration um die grossen Bronchien mit geringer Narbenbildung. Fleckförmige Blähung des Lungen-gerüsts. Auch inmitten der Alveolen fleckförmige, chronisch entzündliche Zellinfiltrate mit Bindegewebsvermehrung. Geringe Hyperämie der Gefässe.

Leber: Normale Läppchenstruktur. Geringe Rundzellinfiltrate im Glissonschen Gewebe.

Niere: Kein pathologischer Befund.

Nebenniere: Starke Hyperämie. Parenchym erhalten. Weite Sinus.

Dünndarm: Geringe subepitheliale Rundzellinfiltrate. Etwas ödematöse Auflockerung der Submukosa. Zylinderepithel überall ohne pathologischen Befund.

Hase Nr. 498. 16 Injektionen à 40 mg/kg i. v. Tier wurde am Tage nach der letzten Injektion bei gutem Allgemeinzustand durch Genickschlag getötet.

Lunge: Die postmortale Färbbarkeit des Lebergewebes hat stark gelitten. Diffuse Pigmentablagerung. Autolytische Veränderungen. Soweit erkennbar liegt eine normale Läppchen-

struktur vor. In den Glissonschen Scheiden wieder Rundzellinfiltrationen.

Niere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Starke Hyperämie mit kräftiger Erweiterung der Milzsinus. Milzstruktur nur noch angedeutet erkennbar. Trabekelsystem nicht erweitert. Kapsel frei.

Thrombovetren.

Hase Nr. 556: 30 Injektionen à 40 mg/kg in einem Zeitraum von 6 Wochen. Gutes Allgemeinbefinden. Kein Gewichtsverlust.

Leber: Leberzellen insgesamt schlecht erhalten, schlechte Färbbarkeit. Protoplasma aufgehellet. Autolytischer Prozess.

Niere: Ohne wesentliche Veränderungen. Geringe Spaltbildung zwischen Glomerulusschlingen und Bowmanscher Kapsel.

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Mässig starke Hyperaemie. Sinus mit Blut gefüllt. Trabekel gut erhalten.

Darm: Kein krankhafter Befund.

Hase Nr. 557: 30 Injektionen à 40 mg/kg in einem Zeitraum von 6 Wochen. Gutes Allgemeinbefinden. Kein Gewichtsverlust.

Leber: Starke lymphocytäre und plasmazelluläre Infiltration des Bindegewebes im Bereich der Glissonschen Scheiden. Am Leberparenchym kein krankhafter Befund.

Niere: Geringe Spaltbildung zwischen Glomerulusschlingen und Bowmanscher Kapsel. Sonst o.B.

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Mässige Hyperaemie. Starke Erweiterung der Sinus.

Thrombozid.

Hase Nr. 503: Das Tier starb nach 9 Injektionen à 40 mg/kg i. v.

Lunge: Peribronchitis mässigen Grades. Das Lungengewebe zeigt entweder eine Blähung, oder aber eine Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes mit Ablagerung von chronisch entzündlichen Zellinfiltraten. Hyperaemie der Gefässe mittleren Kalibers.

Leber: Schwer toxisch geschädigte Leber! Die Leberzellen sind insgesamt gequollen und acino-zentral verfettet. Das Proto-

plasma weist eine starke Vacuolenbildung auf. Die Zellkerne sind teilweise im Untergang begriffen, teilweise zeigen sie eine Karyolyse. Die Zellgrenzen sind nicht mehr erhalten, so dass das helle Protoplasma ineinander übergeht. Vereinzelt ist acino-zentral eine Dissociation der Lebertrabekel zu sehen. Die grösseren Venen sind mit Blut gefüllt. In den Glissonschen Scheiden nur ganz geringe Rundzellinfiltrationen. Die Leberkapillaren erscheinen ebenfalls erweitert, jedoch nicht hyperämisch. Vereinzelt finden sich im Leberparenchym Pigmentablagerungen (Gallepigment ?).

Niere: Der Hauptbefund ist am Tubulusapparat zu erheben. Man erkennt das Bild einer schweren toxischen Schädigung der Niere. Das Nierenparenchym ist in Form von trüber Schwellung verändert. Auch Nekrosen des Tubulusepithels sind vorhanden. Das Lumen der Tubuli ist grösstenteils durch die Schwellung verlegt. Die Kerne sind nur schlecht färbbar und teilweise im Untergang begriffen. Die Glomeruluschlingen erscheinen ebenfalls gequollen und füllen den ganzen Raum bis zur Bowmanschen Kapsel aus.

Nebenniere: Die Zona glomerulosa ist nicht überall gut erhalten und das Protoplasma hier sehr hell, sodass man den Eindruck gewinnt, dass die Zona fasciculata oft bis zur Kapsel reichen würde.

Milz: Wieder starke Hyperaemie. Milzstruktur nur noch schlecht erkennbar.

Dünndarm: Ausser einer ödematösen Auflockerung in der Submukosa ist kein krankhafter Befund zu erheben.

Hase Nr. 504: Das Tier starb nach 2 Injektionen à 40 mg/kg i. v.

Lunge: Chronisch interstitielle Pneumonie mit starker Vermehrung des Bindegewebsgerüsts und reichlich eingelagerten Lymphozyten, Plasmazellen und Fibroblasten. Andere Partien lassen eine Blähung der Alveolen erkennen. Ausgedehnte Thrombenbildung (hyaline Thromben) der Gefässe allen Kalibers.

Leber: Schwer toxisch geschädigte Leber. Ausgedehnte, diffuse Dissociation der Lebertrabekel, besonders acino-zentral.

Starke Erweiterung und Hyperaemie der Leberkapillaren. Vacuolenbildung im Protoplasma der Leberzellen, sowie fleckförmige Nekrosen der Zellen. An zahlreichen Stellen sind keinerlei Zellgrenzen mehr vorhanden. Karyorrhesis und Karyolyse der Zellkerne. Thrombenbildung in den Gefäßen der Glissonschen Scheiden und vereinzelt auch in den Leberkapillaren. Die acino-zentral beschriebenen Leberveränderungen finden sich in verstärkter Form auch subkapsulär. Mit Sudanfärbung ist eine diffuse, jedoch vorwiegend acino-zentrale Verfettung nachweisbar.

- Niere: Schwer toxisch geschädigte Niere mit vollkommenem Untergang des Tubulusapparates, wobei keinerlei Zellstruktur mehr zu erkennen ist und lediglich die Kerne noch einigermassen erhalten sind. Das Lumen der Tubuli ist mit hyalinen Massen ausgegossen. Die Glomeruli weisen im Bereich ihrer Schlingen ebenfalls eine Hyalinisierung auf. An einzelnen Partien sind nur noch die schattenhaften Umrisse der Glomeruli zu erkennen. Überall fällt eine starke Hyperämie auf, und fleckförmig tritt auch eine kräftige Zellinfiltration aus Lymphozyten und Leukozyten zu Tage.
- Milz: Ausgedehnte Hyperämie. Die Struktur ist kaum noch erhalten, die Sinus sind weit und strotzend mit Blut gefüllt, wobei das lymphatische Gewebe komprimiert wird. Von Thrombenbildung ist hier nur wenig zu sehen.
- Ovar: Thrombenbildung in den kleineren Arterien. Ansonsten kein pathologischer Befund.
- Dünndarm: Ödematöse Auflockerung der ganzen Submukosa und diffuse Einlagerung von Rundzellinfiltraten. Die Schleimhaut selbst ist intakt und gut erhalten.
- Dickdarm: Die Schleimhaut ist durchwegs erhalten, jedoch zeigen die Epithelien eine starke Quellung. An manchen Stellen ist eine starke Hyalinablagerung in der Mukosa festzustellen, wobei die Zellgrenzen aufgehoben sind und das Hyalin ineinander übergeht. Das Bild entspricht ebenfalls einer toxischen Schädigung.

Hase Nr. 505: Das Tier bekam 16 Injektionen $\pm$ 40 mg/kg i. v. Es wurde am Tage nach der letzten Injektion in stark reduziertem All-

gemeinzustand und einem Gewichtsverlust von 350 g durch Genickschlag getötet.

- Lunge:** Es liegt das Bild eines fleckförmigen Lungenödems vor, wobei die Alveolen mit einem dünnflüssigen, colloidähnlichen Sekret angefüllt sind, welches reichlich entzündliche Zellinfiltrate enthält. Die alveoläre Struktur ist hierbei grösstenteils nicht mehr erkennbar. Andere Lungenbezirke sind gebläht, oder sehr atelektatisch. Geringe Ausbildung von hyalinen Thromben in den Gefässen mittleren Kalibers.
- Leber:** Es liegt das Bild einer schwerstens, toxisch geschädigten Leber, teilweise vom Aussehen einer akuten gelben Leberatrophie vor. Man erkennt ausgedehnte, vorwiegend acinozentral gelegene nekrotische Bezirke, welche weite Ausläufer haben und miteinander in Verbindung stehen, so dass kleine nekrotische Streifen innerhalb des sonst sehr dissoziierten Lebergewebes erkennbar sind. Diese Veränderungen sind besonders stark auch subkapsulär ausgeprägt. Überall findet sich reichlich Gallepigment. Auch hier Thrombenbildung feststellbar. Teilweise sind die nekrotischen Bezirke auch schon hyalinisiert und enthalten noch vereinzelte Kernreste.
- Niere:** Schwere, trübe Schwellung und teilweiser Untergang des Tubulusapparates. In den Tubuli contorti II. Grades und auch in den Sammelröhren hyaline Thromben. Starke allgemeine Hyperämie. Der Glomerulosapparat scheint intakt zu sein und zeigt lediglich eine starke Hyperämie.
- Nebenniere:** Während die Zona glomerulosa noch teilweise erhalten ist, finden sich in den übrigen Zonen nur noch Nekrosen, wobei fast keinerlei Zellstruktur mehr vorhanden ist. Die Nekrosen werden ringsum umgeben von entzündlichen Zellinfiltraten. Die Zona glomerulosa ist hierbei ebenfalls schon ausgedehnt nekrotisch. Das Nebennierenmark ist grösstenteils erhalten und gegen das Randgebiet des Präparates findet sich auch noch erhaltene Nebennierenrinde. Hierbei fällt eine starke Blähung und schlechte Färbbarkeit sowohl des Protoplasmas als auch der Zellkerne auf. Die Zellstruktur ist auch hier nicht immer deutlich erhalten.

Milz: Gleiche Veränderungen wie bei 504.

Hase Nr. 558: 18 Injektionen zu 20 mg/kg i. v. in einem Zeitraum von 24 Tagen, Tier wurde nach der letzten Injektion getötet. Schlechtes Allgemeinbefinden. Gewichtsverlust von 15 %.

Leber: Starke Hyperämie sowohl der grösseren Gefässe als auch der Leberkapillaren. Letztere enthalten fleckförmig auch hyaline Thromben. Acino-zentrale Dissoziation der Trabekel, geringe Vacuolenbildung im Protoplasma.

Niere: Hyalinisierung des ganzen Tubulusapparates. Fast keinerlei Zell- und Kernfärbbarkeit im Bereich der Tubuli cont. I und II. Ordnung mehr zu erkennen. Die Glomeruli weisen lediglich noch eine Färbbarkeit der Zellkerne auf, während die Schlingen ebenfalls hyalinisiert und im Untergang begriffen sind. Kräftige Spaltbildung. - Schwer degenerativ geschädigte Niere!

Nebenniere: Keine krankhaften Veränderungen.

Milz: Neben älteren Haemosiderinablagerungen findet man auch eine geringgradige Hyperämie. Die Struktur ist schlecht erhalten. Trabekuläres Bindegewebe erscheint vermehrt.

Hase Nr. 559: 11 Injektionen zu 20 mg/kg in einem Zeitraum von 14 Tagen, Tier wurde nach der letzten Injektion durch Genickschlag getötet. Gutes Allgemeinbefinden. Gewichtsverlust von 5 %.

Leber: Kräftige Hyperämie mit starker Erweiterung der Leberkapillaren. Letztere sind strotzend mit Blut gefüllt und drängen die Trabekel auseinander. Auch die Zentralvenen und die übrigen Gefässe zeigen eine starke Hyperämie. - Die Leberstruktur ist noch deutlich erkennbar. Die Leberzellen zeigen gute Färbbarkeit und keinen wesentlichen krankhaften Befund. Keine Degenerationserscheinungen.

Niere: Mässig starke degenerative Veränderungen am Tubulusapparat. Starke Quellung der Tubulusepithelien und Vacuolenbildung. Das Lumen der Tubuli contorti I. Ordnung ist durchwegs stark eingengt und teilweise verschlossen. Die Glomeruli zeigen Hyperämie und zwischen Schlingen und Kapsel findet sich ein grosser Spaltraum. Die übrigen Nierengefässe sind stark hyperämisch und mit Blut gefüllt.

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Starke Hyperämie, sonst kein pathologischer Befund.

Hase Nr. 560: 21 Injektionen zu 20 mg/kg in einem Zeitraum von 28 Tagen. Reduzierter Allgemeinzustand. Gewichtsverlust von 10%. Tier wurde nach der letzten Injektion durch Genickschlag getötet.

Leber: Acino-zentrale Dissociation der Trabekel mit geringer feintropfiger Verfettung und fleckförmiger Vacuolenbildung im Protoplasma der Leberzellen. Leberläppchenstruktur nicht immer deutlich erkennbar. Starke chronisch-entzündliche Zellinfiltration in den Glissonschen Scheiden.

Niere: Starke Quellung der Tubulusepithelien (Tubulus contorti I. Ordnung) mit kräftiger Vacuolenbildung. Teilweise auch Untergang und schlechte Färbbarkeit der Tubulusepithelien nachweisbar. Die Tubuli contorti II. Ordnung sind fast durchwegs gut erhalten und zeigen nur eine Quellung der Epithelien, sodass das Lumen stark eingeengt oder verschlossen ist. Glomeruli intakt.

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Kräftige Hyperämie. Struktur weitgehend aufgehoben. Die Sinus sind mit Blut und nur wenig Zellelementen gefüllt und dadurch stark erweitert.

Dünndarm: Ohne wesentliche Veränderungen.

Elheparin.

Hase Nr. 499: 16 Injektionen à 40 mg/kg i.v.: Das Tier wurde in stark reduziertem Allgemeinzustand und einem Gewichtsverlust von 400 g nach den letzten Injektionen getötet.

Lunge: Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes mit mässig starker, chronisch entzündlicher Zellinfiltration aus Plasmazellen und Lymphozyten. Fleckförmige interstitielle Pneumonie (?). Peribronchial wiederum Rundzellinfiltrate. Auch normales Lungenparenchym vorhanden.

Leber: Dissoziation der Trabekel acino-zentral mit starker Quellung der Leberzellen und teilweiser Entmischung des Protoplasmas. Fleckförmige Nekrosen, Karyolyse und Pyknose besonders in unmittelbarer Nähe der Zentralvenen. Stellen-

weise ist das Lebergewebe aber auch normal. Das Bild entspricht einer toxischen Schädigung. In einem anderen Präparat derselbe Befund, zusätzlich jedoch eine Hyperämie der Kapillaren.

Niere: Trübe Schwellung der Tubuli contorti I. Grades. Fleckförmige Verfettung der Tubulusepithelien, Protoplasmagrenzen oft nicht mehr erkennbar. Hyperämie der Glomeruli. Der Hauptbefund ist am Tubulusapparat. Die Veränderungen entsprechen einer typischen Schädigung.

Milz: Starke Hyperämie. Milzsinus stark erweitert. Milzfollikel deutlich erkennbar.

Dünndarm: Plasmazelluläre Infiltrationen in der Submukosa, alle anderen Schichten frei von Entzündung.

Dickdarm: Mässig starke Rundzellinfiltration in der Submukosa. Schleimhaut durchwegs gut erhalten. Sonst kein pathologischer Befund.

Hase Nr. 501: Das Tier starb nach 6 Injektionen à 40 mg/kg i. v.

Lunge: Fehlt (Präparat nicht zu beurteilen, da falsch behandelt).

Leber: Geringe acino-zentrale Verfettung und starke Quellung der Leberzellen, jedoch keine wesentlichen Trabekelveränderungen. Die Protoplasmagrenzen sind fleckförmig nicht erkennbar und gehen teilweise ineinander über. Karyolyse der Zellkerne, teilweise vollkommener Untergang der Zellen. Mässig starke Rundzellinfiltration in den Glissonschen Scheiden. Starke Hyperämie der Pforta dergefässe. Das Bild entspricht ebenfalls einer toxischen Schädigung.

Niere: Starke trübe Schwellung der Tubuli contorti mit teilweisem Untergang des Tubulusepithels. Fleckförmige Ablösung der Glomeruloschlingen von der Bowmanschen Kapsel mit breiter Spaltbildung zwischen den Schlingen und der Kapsel. Toxisch geschädigte Niere!

Milz: Im wesentlichen der gleiche Befund wie bei 499 nur noch etwas ausgeprägter. Insbesondere sehr starke Hyperämie.

Nebenniere: Normaler Lipoidreichtum und normale Struktur der einzelnen Zonen. Die Zona glomerulosa ist fleckförmig, sehr zellarm und enthält ein entmisches, helles Protoplasma, wobei die Zellgrenzen nicht immer erhalten sind.

Dünndarm: Starke ödematöse Auflockerung der Submukosa. Stellenweise fehlt das Epithel (postmortal, artifizuell?).

Dickdarm: Die Mukosa ist fleckförmig, sehr schlecht färbbar, wobei sich das Epithel der Drüenschläuche abgelöst hat und im Lumen liegt (toxische Schädigung, postmortale Veränderung?).

Hase Nr. 502: Das Tier starb nach 6 Injektionen à 40 mg/kg i. v.

Lunge: Fehlt (Präparat nicht zu beurteilen, da falsch behandelt).

Leber: Im wesentlichen die selben Veränderungen wie bei 501, jedoch nicht ganz so stark, auffallend ist hier eine stärkere Rundzellinfiltration in den Glissonschen Scheiden und eine starke Hyperämie der Pfordadergefäße als auch der Aa. interlobularis.

Niere: Sehr starke Quellung der Tubulusepithelien in vollkommener Verlegung des Lumens und stellenweise vollkommenem Untergang. Grosser Spalt zwischen den Glomerulusschlingen und der Bowmanschen Kapsel, jedoch keine Hyperämie. Schwer toxisch geschädigte Nierenparenchym!

Nebenniere: Auflockerung der Zona glomerulosa. Letztere ist stellenweise nur noch fleckförmig erhalten (artifizuell?) Das Protoplasma zeigt stellenweise eine schlechte Färbbarkeit und weist geringe Vacuolenbildung auf. Die übrigen Schichten der Nebenniere erscheinen normal.

Milz: Die Milzstruktur ist kaum mehr zu erkennen, und die Hyperämie ist so stark, dass auch die Milzsinus nur noch angedeutet zu sehen sind. Das Trabekelsystem ist nicht verbreitert. Die Milzfollikel sind nur noch angedeutet vorhanden.

Dickdarm: Starke ödematöse Auflockerung der Submukosa. Von Epithel ist fast überhaupt nichts mehr zu sehen. Mässig starke Rundzellinfiltration der Submukosa.

Hase Nr. 561: 5 Injektionen zu 20 mg/kg i. v. in einem Zeitraum von einer Woche. Nach der letzten Injektion durch Blutung aus der Einstichstelle verblutet. Gutes Allgemeinbefinden. Kein Gewichtsverlust.

Leber: Geringe acino-zentrale Dissoziation der Leberzellen. Vereinzelt Vakuolenbildung im Protoplasma. Überall diffus,

Gallepigment verstreut. In den Glissonschen Scheiden geringe bis mässig starke Rundzellinfiltration.

Niere: Geringe trübe Schwellung der Tubulusepithelien, in den Tubulus contorti I. Ordnung teilweise auch mit Untergang der Epithelien. Glomeruli gut erhalten. Deutliche Spaltbildung zwischen Schlingen und Bowmanscher Kapsel.

Nebenniere: Kein krankhafter Befund.

Milz: Artifizieell stark zertrümmert. Soweit beurteilbar, ausser mässig starker Hyperämie kein wesentlich krankhafter Befund.

Hase Nr. 458: 12 Injektionen zu 20 mg/kg i. v. in einem Zeitraum von 14 Tagen. Gewichtsverlust von 15 %. Tier wurde nach der letzten Injektion durch Genickschlag getötet, da stark reduzierter Allgemeinzustand.

Leber: Schwere degenerative Leberschädigung. Diffuse grosstropfige Verfettung der Leberzellen. Der Läppchenbau ist fast vollkommen aufgehoben. Die Leberzellen enthalten grosse Vakuolen und oft sind nur noch ihre Kerne erkennbar, während die Zellwände nur rudimentär erhalten sind. Die Leberzellen haben eine wabige Struktur und erscheinen insgesamt sehr aufgehellet. In den Glissonschen Scheiden geringe lymphozytäre und histocytaire Zellinfiltration. Vereinzelt Dissoziation der Trabekel in Umgebung der Zentralvenen.

Niere: Schwere degenerative Schädigung, welche besonders die Tubuli contorti I. Ordnung und II. Ordnung betrifft, während die Sammelröhren weniger betroffen sind. Man erkennt im Bereich der Tubuli keinerlei Basalmembran mehr, es sind lediglich noch die Zellkerne erhalten, während das Protoplasma in eine homogene, eosinfärbbare Masse verwandelt ist. Die Glomeruli sind teilweise noch gut erhalten, an vielen Stellen jedoch ist in den Schlingen eine Quellung deutlich erkennbar, und es finden sich auch hier dieselben homogenen eosinfärbbaren Massen wie in den Tubuli. Teilweise sind die Glomeruli stark degenerativ verändert und nur noch andeutungsweise erkennbar. Sie liegen dann nur noch als Reste inmitten der Tubuli.

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Starke Hyperämie. Die Sinus sind mässig erweitert, die Milzstruktur erkennbar.

Hase Nr. 563: 16 Injektionen zu 20 mg/kg in einem Zeitraum von 20 Tagen. Nach der letzten Injektion durch Blutung aus der Einstichstelle verblutet. Makroskopisch kein pathologischer Befund. Gewichtsverlust 10 %.

Leber: Starke acino-zentrale und geringe acino-periphere Dissoziation der Trabekel mit Hyperämie der Kapillaren. Auch alte Hämosiderinablagerungen nachweisbar. Die grösseren Lebergefässe sind ebenfalls hyperämisch. Keine stärkere Verfettung. Kupfersche Sternzellen erscheinen mitunter vergrössert. Mässig starke lymphozytäre Infiltration der Glissonschen Scheide.

Niere: Ausgedehnte Nekrosen im Tubulusapparat. Wo die Tubulusepithelien noch erhalten sind, findet sich schwere Vakuolenbildung und Quellung der Zellen. Die Glomeruli sind grösstenteils noch intakt, teilweise aber auch schon im Untergang begriffen. Schwere degenerative Schädigung. Von den nekrotischen Tubulusepithelien sind lediglich noch schattenhafte Umrisse der Tubuli vorhanden. Die degenerative Zellschädigung setzt sich teilweise bis in die Sammelröhren fort.

Nebenniere: Keine pathologischen Veränderungen.

Milz: Struktur nur noch andeutungsweise vorhanden. Statt dieser findet sich eine Hyalinisierung und Hyperämie der Sinus. Trabekelsystem noch gut erhalten.

Darm: Nicht beurteilbar. Mukosa artifiziell abgerissen.

Hase Nr. 564: 17 Injektionen zu 20 mg/kg in einem Zeitraum von 22 Tagen. Das Tier starb nach der letzten Injektion unter schockähnlichen Erscheinungen. Gewichtsverlust 15 %. Makroskopisch keine verifizierbaren pathologischen Befunde. Keine Blutung.

Leber: Die Leberzellen zeigen in ihrem Protoplasma eine starke Vakuolenbildung, was auf eine Verfettung und Degeneration schliessen lässt. Ausserdem findet sich vorwiegend acino-zentral eine Dissoziation der Trabekel, die teilweise auch durch eine Hyperämie der Leberkapillaren mitbedingt sein

kann. Sowohl das Protoplasma als auch die Zellkerne der Leberzellen lassen mitunter eine schlechte Färbbarkeit erkennen. Die Kupferschen Sternzellen sind grösstenteils vergrössert und dunkel färbbar. Auch die grösseren Gefässe zeigen eine mässig starke Hyperämie. Keine Vermehrung des Bindegewebes. In den Glissonschen Scheiden nur geringe Rundzellinfiltration.

Niere: Starke Degeneration und fast vollkommener Untergang der Tubulusepithelien, wobei oft lediglich noch die Zellkerne erhalten sind. Vom Plasma ist lediglich noch eine homogene, eosinfärbbare hyalin-artige Masse zu sehen. Die Zellgrenzen sind grösstenteils aufgehoben, auch die einzelnen Tubuli gehen ineinander über. Der Glomerulusapparat ist grösstenteils noch intakt. Starke Spaltbildung zwischen Glomeruli und Bowmanscher Kapsel.

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Struktur nur noch andeutungsweise vorhanden. Starke Hyperämie und Erweiterung der Sinus.

Dünndarm: Submukosa stark ödematös aufgelockert. Kleine Gefässe in der Submukosa stark hyperämisch.

Hase Nr. 562: 20 Injektionen zu 20 mg/kg in einem Zeitraum von 22 Tagen. Tier wurde nach der letzten Injektion in stark reduziertem Allgemeinzustand und einem Gewichtsverlust von 20 % getötet. Makroskopisch kein pathologischer Befund.

Leber: Vorwiegend acino-zentrale Dissoziation der Trabekel. Die Leberzellen zeigen aber noch gute Färbbarkeit. Die Gefässe sind hyperämisch, mitunter auch die Kapillaren. An einer Stelle weisen die Leberzellen allerdings Vakuolenbildung auf.

Niere: Starke Degeneration der Tubulusepithelien mit teilweise vollkommenem Untergang derselben. Die Lumina enthalten oft hyaline Thromben. Die Glomeruli sind mässig erweitert und reichen bis zur Bowmanschen Kapsel. Stellenweise zeigen die Schlingen auch eine schlechte Färbbarkeit. (Schwere degenerative Veränderung im Sinne einer toxischen Schädigung).

Nebenniere: Kein pathologischer Befund.

Milz: Deutliche Hyalinisierung im Bereich der Milzsinus, es kann sich jedoch auch um hyaline Thromben handeln. Die kleinen Gefäße und Sinus sind erweitert und enthalten reichlich Blut.

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wird über die Untersuchungsergebnisse anderer Autoren über das in mancher Hinsicht unterschiedliche pharmakologische Verhalten der Heparinoide im Gegensatz zu den Nativheparinen berichtet. Insbesondere wird Bezug genommen auf die teilweise recht beträchtliche Toxizität verschiedener Handelsheparinoide am Hund, sowie die sehr widersprechenden Angaben der verschiedenen Autoren über das Wirkungsverhältnis Heparinoid zu Heparin.

Im zweiten experimentellen Teil wird über die eigenen Ergebnisse berichtet. Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf in vitro und in vivo Gerinnungsteste, chemisch-physikalische Untersuchungen zur Prüfung der Eigenschaften und des molekularen Aufbaus der Präparate, sowie auf die Prüfung der chronischen Toxizität der Präparate am Kaninchen.

Wir konnten zeigen, dass das Wirkungsverhältnis Heparinoid/Heparin keine konkrete Grösse darstellt, sondern in Abhängigkeit von Bestimmungsmethode und Gerinnungssubstrat starken Schwankungen ausgesetzt ist. Es wurde gefunden, dass die gerinnungshemmende Wirkung der Heparinoide bei Verwendung von Humanplasma als Gerinnungssubstrat wesentlich geringer ist als bei Verwendung von Rinderplasma. Auch ist die Wirkung von Heparin und Heparinoiden auf die verschiedenen Phasen der Blutgerinnung nicht gleichsinnig. Die Heparinoide haben anscheinend auf die Thrombozyten keinen stabilisierenden Effekt, wie mittels des Retraktionstestes nachgewiesen werden konnte.

Bei den chemisch-physikalischen Untersuchungen zeigte das teilsynthetische Präparat Elheparin im Gegensatz zu den untersuchten Nativheparinen beachtliche Unterschiede hinsichtlich optischer Aktivität und Schwefelgehalt. Nicht nur die Heparine, sondern auch die teilsynthetischen und vollsynthetischen Heparinoide zeigen keinen homogenen Molekülaufbau wie elektrophoretisch gezeigt werden konnte.

Auch im biologischen Thrombo-Embolie-Modellversuch erwies sich Heparin den Heparinoiden bei gleicher Dosierung deutlich überlegen. Von Elheparin wird im Durchschnitt ein Drittel mehr benötigt, während Thrombozid in doppelter Dosierung noch keinen Thrombo-Embolie Schutz gibt.

Bei Prüfung der chronischen Toxizität am Kaninchen verursachten die untersuchten Heparinoide Elheparin und Thrombozid im Gegensatz zu Heparin in einer Dosierung von 40 mg/kg schon nach wenigen Injektionen toxisch-degenerative Organschädigungen an Leber und Niere. Auch in einer Dosierung von 20 mg/kg konnten mit den Heparinoiden an diesen Organen pathologische Veränderungen verifiziert werden. Ausserdem fiel der Gewichtsverlust der Tiere auf, welcher bei durchschnittlich 15 % lag. Das Auftreten der nachgewiesenen pathologischen Veränderungen lag auf Grund unserer gerinnungsphysiologischen Untersuchungen demnach für Thrombozid bei der einfachen therapeutischen Dosis, für Elheparin bei etwa der doppelten.

Die therapeutische Breite dieser synthetischen und teilsynthetischen Heparinersatzmittel ist demnach nur gering. Eine längere therapeutische Anwendung beim Menschen sollte daher nach Möglichkeit vermieden und die Präparate nur mit äusserster Vorsicht und unter genauer Abwägung von Nutzen und Schaden angewandt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Yakymchko, M: Diss. München 1956
2. Jorpes, E.: Thrombose und Embolie, B. Schwabe
Basel 1955, p. 298
3. Marx, R.: Arzneimittelforsch. 6, 667 (1956)
4. Gastpar, H., R. Blasius u. W. Seitz:
Z.exp.Med. 126, 554, (1956)
5. Seitz, W., H. Gastpar u. N. Goossens:
"Über die biologische Aktivität und
Toxizität von Heparinen und Heparinoiden". - Symposion für Thrombose,
Embolie und Herzinfarkt, Essen 1957.
6. Studer, A., E. Engelberg u. L.O. Randall:
Thrombose und Embolie, B. Schwabe,
Basel 1955, p. 883.
7. Hardegg, W., H. Hartert u. G. Hieronymi:
Klin.Wschr. 1957, 788
8. Marx, R.: Zit. bei Naegeli u. Ma: Die throm-
boembolischen Erkrankungen und ihre
Behandlung, Schattauer, Stuttgart
1955, p. 131
9. Matis, P.: Thrombose und Embolie, B. Schwabe,
Basel 1955, p. 853
10. Favre-Gilly, J. u. Ma.: Thrombose und Embolie, B. Schwabe,
Basel 1955, p. 309
11. Runge, H. u. I. Hartert: Gynaecologia 138, 110, (1954)
12. Beller, F.K.: Med.Mschr. 1955, 734

13. Hartert, H.: Schweiz.Med.Wschr. 84 , 831, (1954)
14. Goossens, N.: Thrombose und Embolie, B. Schwabe, Basel 1955, p. 370
15. Eysholdt, K.G.: Langebecks Arch. 277, 455, (1955)
16. Meyer, I.O.: Diss. München 1954
17. Hellmann, B.: Diss. München 1954
18. Studer, A. u. A. Winterstein:
Helv.Physiol.Acta 9, 6 (1951)
19. Köstler, H.: Med. Klinik 1956, 664
20. Kautzsch, E.: Dtsch.Med.Wschr. 1956, 1846
21. Blasius, R. u. W. Seitz: Klin.Wschr. 1952, 905
22. Fonio, A.: Schweiz.Med.Wschr. 84, 785, (1954)
23. Goossens, N.: Thrombose und Embolie, B. Schwabe, Basel 1955, p. 374
24. Amann, R.: Symposion über Thrombose, Embolie und Herzinfarkt, Essen 1957. - VI. Europ. Kongr. Haematol., Kopenhagen 1957.
25. Studer, A. u. G. Zbinden: Schweiz.Ztschr. allg.Path.Bakt. 17, 780, (1954)
26. Husemann, E. u. Ma.: Experientia, 9379, (1953)
Z.Naturforsch. 9b, 704, (1954)
27. Jaques, L.B.: J.Biol.Chem. 133, 445, (1940)
Jaques, L.B. u. E. Keeri, Szanto:
Canad.J.Med.Sci. 30, 353, (1952)
28. Marbet, R. u. A. Winterstein:
Helv.Physiol. Acta 9, 24, (1951)
29. Goossens, N., H. Gastpar u. W. Seitz:
VI. Europ. Kongress für Haematologie,
Kopenhagen 1957. - Klin.Wschr. (im Druck)

30. Koller, F.: Symposium über Fortschritte in der
Therapie mit antikoagulantien,
Amsterdam 1957
31. Howell, W.H.: Arch.Intern.Med. 13, 76, (1914)
32. Jürgens, J.: Dtsch. Arch. Klin.Med. 200, 67, (1952)
33. Zit. bei Husemann, E. u. Ma.:
Z. Naturforsch. 10b, 143, (1955)
34. Antweiler, H.J.: Die quantitative Elektrophorese in der
Medizin, 2. Aufl., Springer, Heidel-
berg 1957.
35. Marbet, R. u. A. Winterstein:
Helv. Chem. Acta 34, 2311, (1951)
36. Marbet, R.: Persönliche unveröffentlichte Mit-
teilung.

SCHLUSSWORT

Am Ende meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. W. SEITZ für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. med. H. GASTPAR für seine wertvolle Hilfe und Unterstützung im Fortgang meiner Versuche, bei der Literatursuche, sowie bei der Zusammenstellung der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

LEBENS LAUF

Ich bin geboren in Boryslaw/Ukraine, am 10. Oktober 1919.

Im Jahre 1930 kam ich nach vierjähriger Volksschulzeit auf das Gymnasium, wo ich 1940 mein Abitur machte. Ende des Jahres 1942 nahm ich das Medizinstudium an der Universität Lemberg auf.

1944 mußte ich aus religiösen und politischen Gründen mein Land verlassen und ging nach Deutschland, wo ich im Wintersemester 1946/47 an der Universität München immatrikulierte und mit dem Studium der Zahnmedizin begann. Im Dezember 1949 machte ich das Zahnärztliche Staatsexamen. Nach zehn Monaten praktischer Arbeit in Dillingen/Bayern wanderte ich nach den Vereinigten Staaten von Amerika aus, wo ich in Syracuse im Staat New York lebte und 1956 die amerikanische Staatsbürgerschaft erwarb.

Im April 1956 kehrte ich nach Deutschland zurück wo ich im Oktober 1956 das Zahnärztliche Staatsexamen an der Universität München bestand. Anschließend begann ich das Studium der Medizin. Im Sommer 1958 bestand ich das Ärztliche Staatsexamen und promovierte zum Doktor der Medizin.

